

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 A61K 38/06, A23L 1/305	A1	(11) 国際公開番号 WO99/16461 (43) 国際公開日 1999年4月8日 (08.04.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00480 (22) 国際出願日 1998年2月5日 (05.02.98) (30) 優先権データ 特願平9/262422 1997年9月26日 (26.09.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) カルピス株式会社(CALPIS CO., LTD.)(JP/JP) 〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 増山明弘(MASUYAMA, Akihiro)(JP/JP) 高野俊明(TAKANO, Toshiaki)(JP/JP) 〒229-0006 神奈川県相模原市瀬野辺5丁目11番10号 カルピス株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 酒井 一(SAKAI, Hajime) 〒102-0083 東京都千代田区麹町5丁目7番地 秀和紀尾井町TBRビル Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: ANTISTRESS AGENTS AND FUNCTIONAL FOODS (54) 発明の名称 抗ストレス剤及び機能性食品 (57) Abstract Antistress agents containing as the active ingredient tripeptides, in particular, Ile-Pro-Pro and/or Val-Pro-Pro, having the activity of inhibiting angiotensin converting enzymes and/or salts thereof, and functional foods containing these antistress agents. These agents and foods can be continuously taken everyday without causing any problem in safety and can relieve and prevent mental and physical symptoms caused by stress.		

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

日常的に連用可能で、安全性の問題を含まない、ストレスにより生じる精神的・身体的症状を軽減及び予防できる抗ストレス剤及び機能性食品を提供する。アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド（特にIle-Pro-Pro及び／又はVal-Pro-Pro）及び／又はその塩を有効成分として含有する抗ストレス剤、並びに前記抗ストレス剤を含む機能性食品。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

明 細 書

抗 ス ト レ ス 剤 及 び 機 能 性 食 品

技術分野

本発明は、ストレスにより生じる精神的・身体的症状を予防及び軽減する効果を有する抗ストレス剤及び機能性食品に関する。

背景技術

現代社会は、科学技術が高度化・複雑化し、社会情勢も激動する環境下になっており、人々は様々なストレスにさらされている。特に、国際化された社会においては、複雑な人間関係が形成されており、精神的ストレスが起因する様々な症状について報告がなされている。

精神的ストレスは、循環系、免疫系等に大きな影響を及ぼすとされている。しかし、ストレスの科学的概念及び定義は未だ明確でない点もあり、更に方法論的困難性も相俟って、ストレスの評価に関しては多くの問題が残されているが、近年、医学的見地からの検討がなされている。

例えば、ストレスを受けるとアンジオテンシンⅡ等が増加し、ナトリウム再吸収による体内ナトリウムが過剰となり、血圧の上昇を引き起こすことが報告されている（茂原治ら：代謝，28，2，323，1991）。このような知見を基に、高血圧治療薬として使用されているアンジオテンシン変換酵素阻害剤であるエナラプリル及びアラセプリルのストレスによる高血圧に対する効果が研究されている（The American Journal of Cardiology; 68, 15, 1362(1991), Internal Medicine; 32, 9, 691 (1993)）。しかし、ストレスの負荷は血圧の上昇を引き起こすのみではなく、様々な因子に影響を与え、高血圧の他に消化性潰瘍、虚血性心疾患、脳血管障害、高脂血症等の要因ともなる

と考えられている。従って、ストレスは高血圧の原因因子の一つであるとは考えられているが、逆に単に血圧の上昇を抑制させることによって抗ストレス効果が得られるとは考えられていない。

現在ストレスにより生じる精神的・身体的症状の軽減及び予防剤としては、精神安定剤、抗不安剤及び睡眠薬等の化学合成薬剤が使用されている。しかし、これらの薬剤は、習慣性や副作用の問題があり、ストレスにより生じる精神的、身体的症状予防の目的で日常的に使用するのは好ましくない。そこで、日常的に連用可能で、安全性の問題を含まない、ストレスにより生じる精神的・身体的症状の軽減及び予防効果を示す抗ストレス剤が求められ、開発が進められている。例えば、茶葉に含まれるL-テアニンを含む抗ストレス剤（特開平6-100442号公報）、アンセリン、バレニン、n-メチルヒスチジン、 α -メチルヒスチジン等のイミダゾール化合物を含む抗ストレス組成物（特開平9-20660号公報）、及びグルタチオンと抗酸化物質との組成物を含むストレス改善食品（特開平8-275752号公報）等が提案されている。また、香りによるストレス解消効果についての報告（FRAGRANCE JOURNAL:1991-11, p44-49）もなされている。しかし、トリペプチドを用いることによる、ストレスにより生じる精神的・身体的症状軽減及び予防効果を有するという報告は、これまで認められていない。

発明の開示

本発明の目的は、前述の社会的要請に対応し得る日常的に連用可能で、安全性の問題を含まない、ストレスにより生じる精神的・身体的症状を軽減及び予防できる抗ストレス剤及び機能性食品を提供することにある。

本発明によれば、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド及び／又はその塩を有効成分として含有する抗ストレス剤が提供される。

また本発明によれば、前記トリペプチドが、Ile-Pro-Pro及び／又はVal-Pro-Proであることを特徴とする前記抗ストレス剤が提供される。

更に本発明によれば、前記トリペプチド及び／又はその塩の抗ストレス剤製造のための使用が提供される。

また本発明によれば、前記抗ストレス剤を含む抗ストレス機能を有する食品が提供される。

更に本発明によれば、前記トリペプチド及び／又はその塩の抗ストレス機能を有する食品製造のための使用が提供される。

更に本発明によれば、Ile-Pro-Pro及び／又はVal-Pro-Proの配列を含むペプチド及び／又は蛋白質を含有する培地を、得られる培養液中にIle-Pro-Pro及び／又はVal-Pro-Proのトリペプチドが生産される条件で乳酸菌によって発酵する工程を含む抗ストレス機能を有する食品の製造法が提供される。

また本発明によれば、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド及び／又はその塩を有効量経口投与するストレスの低下方法が提供される。

発明の好ましい実施の態様

本発明の抗ストレス剤は、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド及び／又はその塩を有効成分として含有する。本発明において抗ストレス作用とは、ストレスにより上昇する収縮期血圧及び拡張期血圧を低下させる作用、並びに脾臓細胞反応性の低下等の

ストレスによる免疫機能の低下を抑制又は防止する作用等のストレスを受けていない状態に近づける作用をいう。

前記トリペプチドとしては、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するIle-Pro-Pro、Val-Pro-Pro（以下これらのトリペプチドをそれぞれIPP、VPPと略す）及びこれらの混合物からなる群より選択されるトリペプチドが好ましく挙げられる。

前記トリペプチドの塩としては、薬理学上許容される塩類、例えば塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、及びクエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、乳酸塩等の有機酸塩等が挙げられる。

前記トリペプチドの製造法としては、微生物による発酵法、酵素加水分解法又は化学的合成法等が挙げられる。

前記微生物による発酵法は、前記トリペプチドに対応するアミノ酸配列、例えば配列Ile-Pro-Pro、Val-Pro-Pro等を含むペプチド及び／又は蛋白質を含む食品素材の培地中で乳酸菌を培養する方法が挙げられる。

前記培地としては、前記トリペプチドに対応するアミノ酸配列を含むペプチド及び／又は蛋白質を含む食品素材等が好ましい。前記食品素材としては、乳、乳カゼイン、とうもろこし、コーンタンパク、小麦、小麦タンパク、大豆、脱脂大豆、大豆蛋白等が挙げられる。更に、培地には必要に応じて酵母エキス、ビタミン類、ミネラル類等の他の成分を含有させることができる。

前記乳酸菌としては、ラクトバチルス属の乳酸菌を用いることができる。例えば、ラクトバチルス・ヘルベチカス(*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・デルブルキイ・サブスピーシーズ・ブルガリカス(*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*)、ラクトバチ

ルス・アシドフィラス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ファーマンタム(*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシーズ・カゼイ(*Lactobacillus casei* subsp. *casei*)等の乳酸菌を挙げることができる。具体的には、ラクトバチルス・ヘルベチカス ATCC55796、ラクトバチルス・デルブルキイ・サブスピーシーズ・ブルガリカス ATCC11842、ラクトバチルス・アシドフィラス ATCC4356、ラクトバチルス・ファーマンタム ATCC14931、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシーズ・カゼイ ATCC393等の菌株が挙げられる。

前記培養は、前記培地を加熱殺菌し所定の培養温度まで冷却後に、予め前培養しておいた乳酸菌スターターを添加することにより行うことができる。乳酸菌スターターの接種量は、培地 1 g 当り乳酸菌数 $10^5 - 10^7$ 個とするのが好ましい。培養温度は $20 - 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは $30 - 45^\circ\text{C}$ 、培養時間は 3 - 48 時間、好ましくは 6 - 24 時間の範囲で行うことができる。乳酸菌数が 10^8 個/g 以上及び乳酸酸度が 1 以上となった時点で、培養を終了することができる。得られた培養液中には、培地原料及び組成によるが、通常、IPP 及び／又は VPP が $0.1 - 100 \mu\text{g/g}$ 含まれる。

前記培養液は、そのまま、乳酸菌が生きている状態で本発明の抗ストレス剤として使用できる。また、前記培養液を 80°C 達温等の条件にて加熱殺菌することにより、殺菌した状態で用いることもできる。更に、凍結乾燥、噴霧乾燥、ドラムドライヤー乾燥等により粉末化した状態でも使用できる。

前記培養液は、トリペプチド成分を濃縮し精製してから本発明の抗ストレス剤として使用することができる。前記濃縮及び精製の方法と

しては、遠心された前記培養液の上清を取る方法が挙げられる。また取られた上清を、さらに電気透析、イオン交換樹脂処理、中空糸膜透析、逆浸透圧処理、疎水性カラムクロマトグラフィー等、又はこれらを組み合わせた処理に供することにより、さらに濃縮し精製された前記トリペプチドを得ることができる。

前記酵素加水分解法によりトリペプチドを製造するには、Ile-Pro-Pro、Val-Pro-Pro等の前記トリペプチドに対応するアミノ酸配列を含むペプチド及び／又は蛋白質を含む食品素材を、プロティナーゼで処理し、更にカルボキシペプチダーゼで処理する方法が挙げられる。前記プロティナーゼとしては、微生物由来のプロティナーゼ、植物由来のプロティナーゼ、動物由来のプロティナーゼ等が使用できる。これらのプロティナーゼは、公知の方法で調製することができる。前記カルボキシペプチダーゼとしては、微生物由来のカルボキシペプチダーゼ、植物由来のカルボキシペプチダーゼ、動物由来のカルボキシペプチダーゼ等が使用できる。これらのカルボキシペプチダーゼは、公知の方法で調製することができる。

前記化学的合成法によりトリペプチドを製造する方法としては、公知の有機化学合成法が挙げられる。例えば、トリペプチドを構成するアミノ酸のアミノ基をフルオレニルメトキシカルボニル基で保護した後に、順次アミノ酸配列に従ってフルオレニルメトキシカルボニル基で保護したアミノ酸を常法に従い反応させてトリペプチド結合樹脂を得、さらに常法に従い樹脂を切り離してトリペプチドを精製することにより、前記トリペプチドを得ることができる。

本発明の抗ストレス剤中の前記トリペプチドの含有割合は、後述する有効投与量のトリペプチドを投与しうる含有割合である限りにおい

て特に限定されないが、剤中には、通常0.001～1重量%の割合で配合することができる。

本発明の抗ストレス剤は、前記トリペプチドやその塩の他に、糖類、蛋白質、脂質、ビタミン、ミネラル、香料、色素等の他の添加剤を含んでいても良い。

本発明の抗ストレス剤は、ヒト又は動物に投与することができる。投与経路は、経口、静注等を挙げることができるが、経口投与が好ましい。

本発明の抗ストレス剤の有効投与量は、ヒトにおいてストレス軽減、予防等の本発明の効果を得るためには、前記トリペプチドとして、例えば経口投与の場合は通常0.1～40mg/体重kg・日の範囲とすることができるが、これを超える量を投与してもよい。

本発明の抗ストレス剤を被検者に投与した場合、ストレスの負荷に応答して発生する血圧上昇、免疫機能の低下等の様々な生理的な指標の変化が、非投与時に比べて小さくなり、これらの指標がストレスが負荷されない場合の値に近いものとなる。

本発明の機能性食品は、前記抗ストレス剤を含み、この機能性食品を食することにより前記ストレスが予防、軽減、防止される。

本発明の機能性食品中の前記抗ストレス剤の含有割合は、特に限定されないが、トリペプチド及び／又はその塩の含有量が、前述の抗ストレスに有効な量となるように含有させれば良く、通常機能性食品中にトリペプチド及び／又はその塩の含有量が0.001～0.1重量%となるように抗ストレス剤が含有されておれば良い。

本発明の機能性食品の摂取量は、通常前記トリペプチドとして0.1～40mg/体重kg・日の範囲とすることにより、好ましい本発

明の効果を得ることができるが、これを超える量を摂取してもよい。

本発明の機能性食品としては、ヨーグルト、乳性乳酸菌飲料、チーズ、酸乳配合の加工飲食品、健康食品等が挙げられ、形態としては、粉末状、顆粒状、錠剤等の固体；ペースト状、ゲル状、液状等の流体等が挙げられる。

本発明の抗ストレス剤及び機能性食品の有効成分である前記トリペプチドは、食品素材を乳酸菌により発酵させることによっても得られるものであり、安全性の高いものである。

本発明の抗ストレス剤及び機能性食品は、前記トリペプチドを含むので、安全性が高く、毎日連続摂取することにより各種のストレスにより生じる精神的・身体的症状を軽減及び予防できる。

実施例

以下実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

脱脂粉乳 9 g を水 100 g に溶解し、115℃、20 分間殺菌した後、室温まで冷却してラクトバチルス・ヘルペティカス ATCC-8205 を 1 白金耳接種し、37℃で24 時間培養を行って、1 次スターター（乳酸菌数 5×10^8 個/ml、pH 3.5）を調製した。次いで、90℃達温殺菌した脱脂乳（固形分 9 重量%）2 kg に、1 次スターター 80 g を接種した後に、37℃、24 時間培養を行い、これを 2 次スターターとした。次に、脱脂粉乳 4.5 kg を水 50 kg に溶解し、90℃達温殺菌した後室温まで冷却して、前記 2 次スターターを 2 kg 接種し、37℃で24 時間培養を行い、発酵乳 56 kg を得た。得られた発酵乳中には、全量中の含有量として IPP が 5.4 mg、

V P P が 9 . 5 m g の割合で含有されていた。

実施例 2

実施例 1 で調製した発酵乳 6 k g を 1 0 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて p H 7 . 3 に調整した後、イオン交換樹脂（商品名Amberlite XAD-2、オルガノ社製）1 リットルを加え、更に蒸留水を加えて全量を 2 0 k g とした。攪拌器にて 9 0 分間攪拌後、吸引濾過器により樹脂を濾別し、濾過器フィルター上の樹脂を蒸留水 2 0 k g にて洗浄した後に樹脂を回収した。この回収樹脂にメタノール 0 . 8 k g を加えて攪拌器にて 3 0 分間攪拌した。次にナイロンウール（2 0 0 メッシュ）を用いて濾過し、さらに硬質濾紙で吸引濾過後、濾液をエバポレーターにて 5 5 ℃、減圧濃縮し精製濃縮液 2 0 0 g を得た。この精製濃縮液にイオン交換樹脂（商品名Amberlite IRA-400(OH型)、オルガノ社製）2 5 0 m l を加え、1 0 分間攪拌した後に、硬質濾紙にて吸引濾過して得られた濾液を 1 N 塩酸溶液にて p H 7 に調整後、真空凍結乾燥した。得られた精製乾燥物を 5 m l の蒸留水にて均一に溶解し、カラム（商品名Sephadex G-25、ファルマシア社製）に供し、蒸留水にて溶出し、トリペプチド溶出画分を回収し、真空凍結乾燥してトリペプチド精製画分粉末 5 0 m g を得た。この精製画分粉末 5 0 m g 中には、I P P が 0 . 6 m g 、V P P が 1 . 0 m g 含有されていた。

実施例 3

I P P 、V P P を以下に示す有機化学合成法により合成した。合成は島津製作所製のペプチド自動合成装置（P S S M - 8 型）を用いた固相法によって行った。固相担体としてベンジルオキシベンジルアルコールタイプのポリスチレン樹脂であって、アミノ基をフルオレニルメトキシカルボニル基（以下Fmocと略す）で保護されたプロリンが結

10

合した樹脂 $20 \mu\text{mol}$ を使用した。前記アミノ酸配列に従って、アミノ基がFmoc基で保護されたFmoc-Ile、Fmoc-Pro及びFmoc-Valを $100 \mu\text{mol}$ ずつ、常法に従い、ペプチド配列通り順次反応させてペプチド結合樹脂を得た。次にこのペプチド結合樹脂を 1 ml の反応液（1重量%エタンジチオール、5重量%アニソール、94重量%トリフルオロ酢酸）に懸濁し、室温で2時間反応させてペプチドを樹脂から切離し、同時に側鎖保護基を外した。次に反応混合液をガラスフィルターで濾過した後、無水エーテル 10 ml を加えて精製したペプチドを沈殿させて、3000回転、5分間遠心して分離した。その沈殿を無水エーテルにて数回洗浄した後、窒素ガスを吹き付けて乾燥した。このようにして得られた未精製の合成ペプチド全量を、0.1N塩酸水溶液 2 ml に溶解した後に、全量を、以下の条件に従い C_{18} の逆層カラムを用いたHPLCで、以下の条件に従って精製した。

ポンプ：形式L6200インテリジェントポンプ（日立製作所）

検出機：形式L4000UV検出器（日立製作所）にて 215 nm の紫外外部吸収を検出

カラム：マイクロボンドスフェア $5 \mu\text{C}_{18}$ （ウォーターズ社製）

溶出液：A液；0.1重量%TFA水溶液、B液；0.1重量%TFA入りアセトニトリル

$(B/A+B) \times 100 (\%) : 0 \rightarrow 40\% (60 \text{ 分})$

流速： 1 ml/分

最大吸収を示した溶出面分を分取し、これを凍結乾燥することにより目的とする合成ペプチドIPP及びVPPをそれぞれ 2.1 g 、 0.9 mg 得た。精製ペプチドを全自動タンパク質一次構造分析装置（形式PPSQ-10、島津製作所製）により、ペプチドのN末端から分

析し、さらにアミノ酸分析装置（形式 800 シリーズ、日本分光社製）にて分析した結果、設計通りであることが確認できた。

実施例 4

雄ウィスター系ラット（体重 300 g 程度）24 匹を、1 週間予備飼育した。予備飼育期間中及び実験期間中は、固形飼料（商品名 CE-2、日本クレア製）を制限食として与え、水は自由摂取とした。

予備飼育終了後、ラットを(1)ストレス無負荷－生理食塩水投与群、(2)ストレス負荷－生理食塩水投与群、(3)ストレス負荷－VPP、IPP 投与群の 3 群に分け（各群 8 匹）、(2)群及び(3)群の動物に、低温室（4℃）に 1 日につき 4 時間入れる寒冷ストレスを 9 日間負荷した。

10 日目に、試料として、(1)及び(2)群のラットには生理食塩水 1 ml を、(3)群には実施例 3 の方法により合成した IPP 及び VPP を各 3 mg / kg 体重の濃度になるように溶解した生理食塩水 1 ml を、経口ゾンデにて胃内に強制投与した。投与後、(2)群及び(3)群のラットに 4 時間の寒冷ストレスを負荷し、ストレス負荷終了の 2 時間後に、無加温、非観血値的ラット血圧計（形式：PE-300 型、シーエスアイ社製）を用いて tail-cuff 法にて、各群のラットの血圧を測定した。結果を表 1 に示す。

血圧の測定結果を表 1 に示す。表 1 に示すように、ストレスを負荷した(2)群では、ストレスを負荷していない(1)群に比べ、収縮期血圧、拡張期血圧共に高くなっていた。VPP 及び IPP を投与した(3)群では、生理食塩水を投与した(2)群に比べ、収縮期血圧、拡張期血圧共に低くなっており、血圧の値がストレスを負荷していない(1)群に近くなっていた。

表 1

実験群	収縮期血圧(mmHg)	拡張期血圧(mmHg)
(1) ストレス無負荷－生理食塩水投与群	121	97
(2) ストレス負荷－生理食塩水投与群	136*	107
(3) ストレス負荷－VPP、IPP投与群	129	101

* (1)群に対し、5%の危険率で有意差あり

寒冷ストレス負荷前後の血圧の変動を表2に示す。表2に示すように、ストレスを負荷した(2)群では、ストレスを負荷していない(1)群に比べ、収縮期血圧、拡張期血圧共に有意に上昇していた。VPP及びIPPを投与した(3)群では、生理食塩水を投与した(2)群に比べ、収縮期血圧、拡張期血圧共に上昇が抑制されており、収縮期血圧では有意差が認められた。以上の結果から、IPP及びVPPを投与することにより、ストレス負荷後における血圧上昇を抑制する効果が得られることが確認された。

表 2

実験群	収縮期血圧(Δ mmHg)	拡張期血圧(Δ mmHg)
(1) ストレス無負荷－生理食塩水投与群	-2.2	-2.5
(2) ストレス負荷－生理食塩水投与群	11.2*	6.1*
(3) ストレス負荷－VPP、IPP投与群	3.7#	-0.6

* (1)群に対し、5%の危険率で有意差あり

(2)群に対し、5%の危険率で有意差あり

実施例 5

雄ウィスター系ラット（体重300g程度）24匹を1週間予備飼育した。予備飼育期間中及び実験期間中においては、固形試料（CE-2、日本クレア製）を制限食にて与え、水は自由摂取とした。

予備飼育終了後、ラットを(1)生理食塩水投与群、(2)VPP投与群及び(3)IPP投与群の3群に分けた（各群8匹）。(1)群－(3)群の

13

ラットを、実施例4と同様に低温室（4℃）に1日につき4時間入れ、9日間寒冷ストレスを負荷した。

10日目に、試料として、(1)群は生理食塩水1mlを、並びに(2)群及び(3)群にはそれぞれ実施例3の方法により合成したVPP 3mg/kg体重又はIPP 3mg/kg体重となるよう溶解した生理食塩水1mlを、経口ゾンデにて胃内に強制投与した。投与後、(1)群—(3)群のラットについて、実施例4と同様に4時間の寒冷ストレスを負荷し血圧を測定した。結果を表3に示す。

血圧の測定結果を表3に示す。表3に示すように、トリペプチドを投与した(2)及び(3)群では、生理食塩水を投与した(1)群に比べ、収縮期血圧、拡張期血圧共に有意に低くなっており、トリペプチドを投与することによりストレス負荷後における血圧上昇を抑制する効果が得られることが認められた。

表3

実験群	収縮期血圧(mmHg)	拡張期血圧(mmHg)
(1) 生理食塩水投与群	138	110
(2) VPP投与群	131*	101*
(3) IPP投与群	130*	102*

* (1)群に対し、5%の危険率で有意差あり

実施例6

試料として、(1)群は生理食塩水2mlを、並びに(2)群及び(3)群にはそれぞれ実施例1で得た発酵乳5ml/kg体重又は実施例2で得たトリペプチド精製画分粉末150mg/kgを生理食塩水に溶解し2mlとしたものを用いた他は実施例5と同様に試験を行い、試料投与、ストレス負荷後に血圧を測定した。

血圧の測定結果を表4に示す。表4に示す通り、発酵乳を投与した

(2)群及びトリペプチド精製画分粉末を投与した(3)群と、生理食塩水を投与した(1)群とを比べると、収縮期血圧、拡張期血圧ともに(1)群より(2)群及び(3)群の方が低くなっており、発酵乳及びトリペプチド精製画分を投与することにより、ストレス負荷後における血圧上昇を抑制する効果が得られることが認められた。

表 4

実験群	収縮期血圧(mmHg)	拡張期血圧(mmHg)
(1)生理食塩水投与群	135	106
(2)発酵乳投与群	132	99*
(3)トリペプチド精製画分投与群	128*	101*

* (1)群に対し、5%の危険率で有意差あり

実施例 7

雄ウィスター系ラット（体重300g程度）24匹を1週間予備飼育した。予備飼育期間中は、固形飼料（商品名CE-2、日本クレア製）を制限食として与え、水は自由摂取とした。

予備飼育終了後、ラットを(1)ストレス無負荷－生理食塩水投与群、(2)ストレス負荷－生理食塩水投与群、(3)ストレス負荷－VPP、IPP投与群の3群に分け（各群8匹）、(2)群及び(3)群の動物に、金網拘束ケージに入れ呼吸ができるように頭部が水面から出るようにして頭部より下を25℃の水槽に浸すことにより、水浸拘束ストレスを1日について6時間、5日間連続して負荷した。ストレス負荷期間中は、固形飼料（商品名CE-2、日本クレア製）及び水を自由摂取させた。

各ラットには、ストレス負荷開始日より負荷終了日まで5日間連続して試料を投与した。試料としては、(1)及び(2)群には生理食塩水1mlを、(3)群には実施例3の方法により合成したIPP及びVPP

を各 $3 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重の濃度になるように溶解した生理食塩水 1 ml を、経口ゾンデにて胃内に強制投与した。

ストレス負荷 2 日目から 3 日目にかけて代謝ケージにて尿を採取し、尿中のカテコールアミン、インドールアミンを HPLC を用いて分析した。カラムは日本分光社製シリカ逆層カラム（商品名「カテコールパック」）を、検出装置は esa 社製電気化学検出器（商品名「クロケム」）を使用した。

ストレス負荷最終日のストレス負荷終了後、断頭によりマウスを屠殺し血液を採取し、胸腺及び脾臓を摘出した。血清については、アミノ酸分析装置（形式 800 シリーズ、日本分光社製）にてアミノ酸組成を測定し、Fischer 比（分枝鎖アミノ酸／芳香族アミノ酸のモル比）を算出した。胸腺及び肝臓は重量を測定し、脾臓については以下の方法により脾臓細胞を調製し、脾臓細胞のインターロイキン 2 産生能及びマイトジェン反応性を測定した。

（脾臓細胞の調製）

摘出した脾臓をホモジェナイザーで細かく破碎し、低張処理することによって赤血球を除去し、2% 牛胎児血清（FCS）含有 MEM で洗浄後、10% FCS 含有 RPMI 1640 培地に細胞数が 1×10^7 となるように浮遊させ、遊離浮遊細胞液を作成した。

（インターロイキン 2 産生能の測定）

調製した前記脾臓細胞 2.5×10^6 個、コンカナバリン A（Con A） $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、及び 10% FCS を含む RPMI 1640 培地を調製し、24 時間培養し、その上清中のインターロイキン 2 量を測定した。インターロイキン 2 量はインターロイキン 2 反応性細胞株の増殖を指標としたバイオアッセイにより測定した。

(マイトジェン反応性)

C o n A又はポークウィートマイトジェン (P W M) をマイトジェンとし、これらのいずれか一方の $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、調製した前記脾臓細胞 5×10^6 個、及び 10% F C Sを含むR P M 1 6 4 0培地を調製し、24時間培養し、24時間後の細胞数をM T T (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)の取り込みを指標とした吸光度により測定し、マイトジェンを含まない時の細胞数に対する比率で表した。

表5にストレス負荷2日目から3日目の尿中ノルアドレナリン、ドーパミンの排泄量を示す。表5に示すように、ストレスを負荷した(2)群ではストレスを負荷していない(1)群に比べ、尿中ノルアドレナリン、ドーパミンの排泄量が有意に低下していた。トリペプチドを投与した(3)群では、生理食塩水を投与した(2)群に比べ、尿中ノルアドレナリン、ドーパミン排泄量共に低下が抑えられる傾向にあった。従って、I P P、V P Pはストレス負荷した後の尿中ノルアドレナリン、ドーパミン排泄量の低下を抑制する効果を有することが認められた。

表5

実験群	ノルアドレナリン (mg/日)	ドーパミン (mg/日)
(1) ストレス無負荷-生理食塩水投与群	0.296	0.466
(2) ストレス負荷-生理食塩水投与群	0.168*	0.287*
(3) ストレス負荷-V P P、I P P投与群	0.231**	0.396**

* (1)群に対し、5%の危険率で有意差あり

(2)群に対し、10%の危険率で有意差あり

表6に屠殺後の血清アミノ酸のFischer比を示す。表6に示すように、ストレスを負荷した(2)群ではストレスを負荷していない(1)群に比べ、Fischer比が有意に低くなっていたが、トリペプチドを投与し

17

た(3)群では、生理食塩水を投与した(2)群に比べ、Fischer比が有意に高くなっていた。

表 6

実験群	Fischer比
(1) ストレス無負荷－生理食塩水投与群	3.34
(2) ストレス負荷－生理食塩水投与群	2.97*
(3) ストレス負荷－V P P、I P P投与群	3.27 [#]

* (1)群に対し、5%の危険率で有意差あり

(2)群に対し、5%の危険率で有意差あり

表 7 に屠殺後の胸腺及び脾臓の重量を示した。ストレスを負荷した(2)群ではストレスを負荷していない(1)群に比べ、胸腺、脾臓共に重量が大きく低下していた。トリペプチドを投与した(3)群では、若干ではあるが胸腺重量及び脾臓重量が生理食塩水を投与した(2)群に比べ高い傾向を示した。

表 7

実験群	胸腺重量 (mg)	脾臓重量 (mg)
(1) ストレス無負荷－生理食塩水投与群	433	769
(2) ストレス負荷－生理食塩水投与群	202*	453*
(3) ストレス負荷－V P P、I P P投与群	226*	495*

* (1)群に対し、5%の危険率で有意差あり

表 8 に脾臓細胞のマイトジェン反応性を、表 9 に脾臓細胞のインターロイキン 2 産生能を示す。ストレスを負荷した(2)群ではストレスを負荷していない(1)群に比べ、マイトジェン反応性の低下とインターロイキン 2 産生能の低下傾向が認められたが、トリペプチドを投与した(3)群では、生理食塩水を投与した(2)群に比べ、マイトジェン反応性の上昇とインターロイキン産生能が上昇傾向が認められた。

表 8

実験群	マイトジェン反応性	
	ConA	PWM
(1) ストレス無負荷－生理食塩水投与群	1.91	1.45
(2) ストレス負荷－生理食塩水投与群	1.56*	1.26*
(3) ストレス負荷－VPP、IPP投与群	1.80 [#]	1.37 [#]

* (1) 群に対し、5%の危険率で有意差あり

(2) 群に対し、5%の危険率で有意差あり

表 9

実験群	インターロイキン2産生能 (Unit/ml)
(1) ストレス無負荷－生理食塩水投与群	6094
(2) ストレス負荷－生理食塩水投与群	4431
(3) ストレス負荷－VPP、IPP投与群	7086 [#]

(2) 群に対し、10%の危険率で有意差あり

これらの結果より、IPP、VPPの投与は、ストレスの負荷による血中アミノ酸のバランス(Fischer比)の変化、胸腺や脾臓の萎縮、脾臓細胞反応性の低下等の免疫機能指標の低下に対し抑制効果を有することが認められた。

請求の範囲

- 1) アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド及び／又はその塩を有効成分として含有する抗ストレス剤。
- 2) 前記トリペプチドが、Ile-Pro-Pro及び／又はVal-Pro-Proである請求の範囲1に記載の抗ストレス剤。
- 3) アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド及び／又はその塩を含む抗ストレス剤製造のための使用。
- 4) 請求の範囲1に記載の抗ストレス剤を含む抗ストレス機能を有する食品。
- 5) アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド及び／又はその塩を含む抗ストレス機能を有する食品製造のための使用。
- 6) Ile-Pro-Pro及び／又はVal-Pro-Proの配列を含むペプチド及び／又は蛋白質を含有する培地を、得られる培養液中にIle-Pro-Pro及び／又はVal-Pro-Proのトリペプチドが生産される条件で乳酸菌によって発酵する工程を含む請求の範囲4に記載の抗ストレス機能を有する食品の製造法。
- 7) アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するトリペプチド及び／又はその塩を有効量経口投与するストレスの低下方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61K38/06, A23L1/305

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A61K38/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database Medline on Dialog, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. 95211811, Kuwajima I, "Effect of perindopril on 24-hour blood pressure levels and mental stress in elderly hypertensive patients" abstract, CLINICAL THERAPEUTICS, Vol. 16, No. 6 (1994) p.962-971	1-6
Y	Oben, J. A., "The stimulation of IL-2 production by anti-rheumatic drugs", Immunology, Vol. 67, No. 3 (1989) p.328-332	1-6
Y	Hazelette, Jeffrey R. "A 52-weeks oral chronic toxicity study on CGS 14824A in rats", Basic Pharmacology & Therapeutics (Yakuri to Chiryo), Vol. 19, No. 10 (1991) p.3863-3891	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
May 1, 1998 (01. 05. 98)

Date of mailing of the international search report
May 12, 1998 (12. 05. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yeung, John H. K., "Effects of sulfhydryl and Non-sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitors on mitogen-induced proliferation of mouse splenocytes", Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., Vol. 15, No. 10 (1993) p.699-707	1-6
Y	Database Medline on Dialog, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. 94191281, Saitoh M, "Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, alacepril, on cardiovascular and sympathetic nervous responses to mental stress in patients with essential hypertension", abstract, Internal Medicine, Vol. 32, No. 9 (1993) p.691-694	1-6
Y	Masuda, Osamu, "Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats", J. Nutr., Vol. 126, No. 12 (1996) p.3063-3068	1-6
Y	Nakamura, Yasunori, "Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from in that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme", J. Dairy Sci., Vol. 78, No. 6 (1995) p.1253-1257	1-6
A	Nobuhito Sato, "Stress and Immune System/Immunocytes (in Japanese)", Strides of Medicine, separate volume, "Stress Response and Redox Control (in Japanese)", (The May 30 issue, 1996) p.61-65	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00480

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 7 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K38/06, A23L1/305

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K38/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Database Medline on Dialog, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. 95211811, Kuwajima I, "Effect of perindopril on 24-hour blood pressure levels and mental stress in elderly hypertensive patients" abstract, CLINICAL THERAPEUTICS, Vol. 16, No. 6 (1994) P. 962-971	1-6
Y	Oben, J. A., "The stimulation of	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.05.98

国際調査報告の発送日

12.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	IL-2 production by anti-rheumatic drugs", Immunology, Vol. 67, No. 3 (1989) P. 328-332	
Y	Hazelette, Jeffrey R. "A 52-weeks oral chronic toxicity study on CGS 14824A in rats", 薬理と治療 (Yakuri to Chiryō), Vol. 19, No. 10 (1991) P. 3863-3891	1-6
Y	Yeung, John H. K., "Effects of sulfhydryl and Non-sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitors on mitogen-induced proliferation of mouse splenocytes", Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., Vol. 15, No. 10 (1993) P. 699-707	1-6
Y	Database Medline on Dialog, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. 94191281, Saitoh M, "Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, alacepril, on cardiovascular and sympathetic nervous responses to mental stress in patients with essential hypertension", abstract, Internal Medicine, Vol. 32, No. 9 (1993) P. 691-694	1-6
Y	Masuda, Osamu, "Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats", J. Nutr., Vol. 126, No. 12 (1996) P. 3063-3068	1-6
Y	Nakamura, Yasunori, "Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from in that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme", J. Dairy Sci., Vol. 78, No. 6 (1995) P. 1253-1257	1-6
A	佐登 宣仁「ストレスと免疫系・免疫細胞」別冊・医学のあゆみ「ストレス応答とレドックス制御」(1996年5月30日発行) P. 61-65	1-6

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲7は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.